

525,145

Rec'd PCT/PTO 16 FEB 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月25日 (25.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/024174 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/00, 38/21, 38/36, 38/53, 48/00, A61P 35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011080

(22) 国際出願日: 2003年8月29日 (29.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-254967 2002年8月30日 (30.08.2002) JP(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アンジェ
ス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒
560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町一丁目四番二号
Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 珠玖 洋
(SHIKU, Hiroshi) [JP/JP]; 〒514-0061 三重県 津市 一
身田上津部田 1547-32 Mie (JP).(74) 代理人: 古谷 聡, 外(FURUYA, Satoshi et al.); 〒103-
0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 浜町花長
ビル6階 Tokyo (JP).(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR REGULATING THE ACTIVITY OF REGULATORY T CELLS

(54) 発明の名称: 制御性T細胞の活性を制御する方法および組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a composition for regulating the activity of regulatory T cells and a regulation method. Namely, a composition containing an antigen recognized by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells or an expression vector encoding the antigen and a method of regulating an immune response of a mammal by administering the composition to the mammal. Thus, means useful in preventing and treating autoimmune diseases and allergic diseases and inhibiting rejection reaction and graft-versus-host reaction in transplantation is provided. Furthermore, the immunosuppressive state is relieved by administering interferon γ or administering a combination of interleukin 12 with interleukin 18. That is to say, regulatory T cells can be artificially controlled by appropriately combining the action of such a cytokine with the sensitization with SEREX antigen, which is applicable to autoimmune diseases, reactions accompanying organ transplantation, allergic reactions, regulation of tumor immunity and so on.(57) 要約: 本発明は、制御性T細胞の活性を制御するための組成物および制御方法を提供する。CD4⁺CD25⁺制御性T細胞が認識する抗原または抗原をコードする発現ベクターを含む組成物および該組成物を哺乳動物に投与して哺乳動物の免疫応答を制御する方法に関するものであり、自己免疫疾患およびアレルギー疾患の予防や治療、移植における拒絶反応や移植片対宿主反応の抑制に有用な手段を提供するものである。さらに免疫抑制状態はインターフェロン・ガンマの投与、あるいはインターロイキン12とインターロイキン18の併用投与によって解除される。すなわち、こうしたサイトカインの作用とSEREX抗原による感作とを適切に組み合わせることにより、制御性T細胞を人為的に操作することができ、自己免疫疾患、臓器移植に伴う反応、アレルギー反応および腫瘍免疫の制御等に適用することができる。

WO 2004/024174 A1

明細書

制御性 T 細胞の活性を制御する方法および組成物

発明が属する技術分野

本発明は生体内において免疫能の制御に関わる制御性 T 細胞の活性を制御する方法、特にその制御活性を有する組成物に関する。

従来の技術

ヒトは外来の異物を排除する生体防御機構が備わっていると同時に自己に対する寛容が成立しており、こうした免疫応答の誘起や制御は B リンパ球、T リンパ球、抗体および抗原提示細胞 (APC) の間の相互作用により行われる。まず、外来抗原は APC によるプロセッシングを受け、主要組織適合複合体 (MHC) クラス I およびクラス II 分子に結合され、ヘルパー T 細胞に提示される。ヘルパー T 細胞により MHC に結合した外来抗原が認識されることにより、T 細胞の活性化が起こり、サイトカインが分泌され、抗原で刺激された B 細胞が抗体産生細胞へと分化するのを助けると共に、キラー T 細胞の分化も促す。分泌された抗体および活性化されたキラー T 細胞により抗原を提示する細胞が排除され、外来抗原を排除する細胞性・体液性の反応が進行する。すなわち、T 細胞が中心的な役割を果たして、標的となる抗原を認識し免疫応答が動員される。例えば、抗腫瘍免疫応答においても、CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞が極めて重要な役割を果たしていることが古くから知られている。(L. Gross, Cancer Res. 3: 326-333 (1943); L. Old et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 101: 80-106 (1962); R. J. North, Adv. Immunol. 35: 89-155 (1984); P. D. Greenberg, Adv. Immunol. 49: 281-355 (1991); D. M. Pardoll and S. L. Topalian, Curr. Opin. Immunol. 10: 588-594 (1998))。

CD8⁺CTL (cytotoxic T cell) は、生体内においても試験管内においても直接的に

腫瘍細胞を破壊する能力を持つ主要なエフェクター細胞であるが、MHC クラス I に提示された抗原ペプチドの特異性に関して厳格であるのに対し、ナチュラルキラーT (NKT) 細胞の場合は抗原特異性の制約が緩く、固有性の免疫応答を示すエフェクター細胞であると考えられている (M. J. Smyth et al., J. Exp. Med. 191: 661-668 (2000); M. J. Smyth & D. I. Godfray, Nature Immunol. 1: 459-460; M. J. Smyth et al., Curr. Opin. Immunol. 14: 165-171 (2002); T. Kawano et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA 95: 5690-5693 (1998))。一方、CD4⁺T 細胞は直接には腫瘍細胞を破壊しないが、抗腫瘍免疫応答を複数の機構を通して制御する基本的な役割を担っているとされており (K. Hung et al., J. Exp. Med. 188: 2357-2368 (1998); F. Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187: 693-702 (1998); D. M. Pardoll & S. L. Toplian, Curr. Opin. Immunol. 10: 588-594 (1998); R. F. Wang, Trends. Immunol. 5: 269-276 (2001))、MHC クラス II 分子に提示された腫瘍抗原ペプチドを認識した CD4⁺ヘルパーT 細胞は、抗原提示細胞 (APC) との相互作用による CTL の活性化と増殖とを増幅する。これに対し、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) は抗腫瘍免疫応答や種々の自己免疫病の進展を抑制するのに有効であることが示されてきた (E. M. Schvach, Annu. Rev. Immunol. 18: 423-449 (2000); M. G. Roncarolo & M. K. Levings, Curr. Opin. Immunol. 12: 676-683 (2000); J. Shimizu et al., J. Immunol. 163: 5211-5218 (1999); S. Sakaguchi et al., Immunol. Rev. 182: 18-32 (2001))。しかしながら、Treg が認識する自己抗原ペプチドはどんなものであり、抗原認識や機能におけるヘルパーT 細胞との違いや関係は何であるかについては明らかにされていない (S. Sakaguchi, Nature Immunol. 2: 283-284 (2001); K. J. Maloy & F. Powrie, Nature Immunol. 2: 816-822 (2001); E. M. Shevach, Nature Rev. Immunol. 6: 389-400 (2002))。

CTL の定量的および定性的な増幅において、ヘルパーT 細胞、CTL および APC 間の連続的な細胞間相互作用では、抗腫瘍免疫応答に関係するヘルパーT 細胞が

広い範囲の多様な抗原を認識する可能性が示唆されていた (J. P. Ridge et al., Nature 393: 474-478 (1998); S. R. M. Bennett et al., Nature 393: 478-480 (1998); S. P. Schoenberger et al., Nature 393: 480-483 (1998); Z. Lu et al., J. Exp. Med. 191: 541-550 (2000)) が、本発明者らは、CTL 認識抗原とともに SEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning) 抗原を投与することにより、極めて強力な CTL 活性の増強、そして強力な腫瘍拒絶能を誘導することを見出した (H. Nishikawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 14571-14576 (2001); WO 03/000894 A1)。その結果、CD4⁺ヘルパー抗原、好ましくは SEREX 法により見つけられた分子、および、CD8⁺CTL により認識される抗原、好ましくは腫瘍抗原をコードする発現ベクターを含む組成物をポリヌクレオチドワクチンとして用いるという、腫瘍特異免疫を発現させるためのワクチンに関する発明に至った (WO 03/000894 A1)。

CD4⁺CD25⁺T 制御性細胞は機能的に成熟した状態で常時正常胸腺において産生されているが、通常はアナジューの状態にあり、T 細胞リセプター (TCR) 刺激が入ると他の T 細胞の活性化・増殖を強く抑制し、その際構成的に発現する CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) 分子や GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family) 分子を介した刺激伝達が増強能発現に必要であることが明らかにされてきた (T. Takahashi et al., J. Exp. Med. 192: 303-310 (2000); S. Read et al., J. Exp. Med. 192: 295-302 (2000); J. Shimizu et al., Nature Immunol. 3: 135-142 (2002))。Treg は MHC クラス II に結合した自己抗原を認識する多くの特異性を持つ細胞から成り立っていると考えられているが、未だ抗原は同定されておらず、また Treg の抑制能増強の機構については全く不明であった。

発明の開示

マウスやヒトなどの正常個体においては、外来の異物に対する生体防御機構と

しての免疫システムが備わっており、自己を攻撃することはない。この自己に対する寛容は、自己反応性免疫細胞の排除、自己反応性免疫細胞の不活化および Treg による免疫抑制の 3 つの機構によるものと考えられている。そして、自己に対する寛容が破綻すると自己免疫疾患を発症する一方で、この自己寛容性が癌細胞の増殖を許している。また、臓器や組織の移植にあつては、外来抗原の排除機構が移植を困難なものとしている。こうした免疫システムにおいて Treg が免疫制御に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた現在にあつて、免疫異常による疾患、特に自己免疫疾患や移植拒絶反応、移植片対宿主反応、アレルギー疾患などに対して、Treg の活性を制御する方法および薬剤の開発が強く望まれる。

本発明者は腫瘍抗原をコードする発現ベクターと SEREX 抗原をコードする発現ベクターとを担癌マウスに投与してその抗腫瘍効果を検討する際に、SEREX 抗原をコードする発現ベクターのみを投与すると、むしろ腫瘍組織の成長と転移の促進が観察されたことから本発明に到達した。

本発明は $CD4^+CD25^+$ 制御性 T 細胞により認識される抗原を含む組成物を提供する。また、上記組成物を哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物において免疫応答を抑制する方法を提供する。さらに薬理上有効な量の上記組成物を哺乳動物へ投与することを含む自己免疫疾患の予防及び／または治療する方法を提供する。または上記組成物を自己免疫疾患の予防剤及び／または治療剤を製造することに用いる用途を提供する。

さらに、薬理上有効な量の上記組成物を哺乳動物へ投与することを含むアレルギー疾患の予防及び／または治療する方法または上記組成物をアレルギー疾患の予防剤及び／または治療剤を製造することに用いる用途を提供する。

また、薬理上有効な量の上記組成物を哺乳動物へ投与することを含む、臓器または組織の移植において拒絶反応及び／または移植片対宿主反応を抑制する方法

または上記組成物を臓器または組織の移植において拒絶反応及び／または移植片対宿主反応を抑制する予防剤及び／または治療剤を製造することに用いる用途を提供する。

より詳細には、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞（制御性 T 細胞）を SEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning) 法により見つけれられた分子（SEREX 抗原）で感作して制御性 T 細胞の活性を増強し、逆に活性化された制御性 T 細胞の活性をインターフェロン・ガンマの使用あるいはインターロイキン 12 とインターロイキン 18 との共用により減弱させることによる、制御性 T 細胞の活性の制御方法である。特に、制御性 T 細胞の活性を増強する組成物として、SEREX 抗原をコードする発現ベクターを含むポリヌクレオチドが挙げられ、ポリヌクレオチド単独で、あるいは担体粒子等の上に固定されて細胞内に投与されるものである。

本発明の目的は、制御性 T 細胞を人為的に抗原によって感作してその免疫抑制活性を増強することにより、移植における拒絶反応および移植片対宿主反応の抑制、自己免疫疾患の抑制およびアレルギー反応の抑制を実現することであり、これらの疾患あるいは病態を有する患者に対する有効な治療法を提供することにある。

本発明は、免疫を抑制するための方法に関するものであり、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞により認識される抗原をコードする発現ベクターを投与することにより、免疫反応を抑制することが出来るという発見に基づくものである。従って、本発明は $CD4^+CD25^+T$ 細胞により認識される抗原またはそれをコードする発現ベクターを含む組成物に関する。より詳細には、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞により認識される抗原は好ましくは SEREX 法により見つけれられた分子であり、また抗原はヘテロ抗原であってもよいし自己抗原であってもよいが、自己抗原がより好ましい。SEREX 法は、近年 M. Pfreundschuh ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-1918 (1997)) により

開発された方法であり、ヒト血清を用いてヒト腫瘍の cDNA 発現ライブラリーの検索を行うものであり、インターネットには、SEREX 法により同定された遺伝子が SEREX データベースとして 1800 種を超えて登録されている

(www.licr.org/SEREX.html)。これらに限定されるわけではないが、例えば熱ショックタンパク質である DnaJ-like2 (GenBank Accession No. : NM_005494, XM_028966, XM_172161, XM_052862, XM_062754, XM_093388, NM_016306, NM_012328, NM_005880)、ガレクチン [Galectin] 8 (GenBank Accession No. : AH008815, AF193806, AF193805)、ポリ A 結合タンパク質 [PolyA binding protein] (GenBank Accession No. : XM_067844)、リガーゼ [Ligase] 1 (GenBank Accession No. : NM_000234) 等を挙げることができる。本明細書中の「SEREX 同定分子」とは、SEREX 法により同定されたこれらの分子を意味する。

本発明において抗原をコードするポリヌクレオチドは、本発明の方法により宿主動物に投与することにより所望の免疫応答を生じさせ得る限り、特に限定されるものではなく、DNA または RNA であり得る。本発明の抗原をコードするポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが所望の免疫応答を宿主において生じさせることができる限り、そのヌクレオチド配列が配列部位特異的変異誘発法等の公知の手法により (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons, Section 8.1-8.5 参照) 人工的に 1 以上のアミノ酸配列を欠失・置換・挿入・付加されたものでもよい。また、所望の免疫応答を宿主動物において生じさせ得る限り、自然界に存在する変異体は、公知のハイブリダイゼーション技術 (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons, section 6.3-6.4 参照) および遺伝子増幅技術 (PCR) (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons, section 6.1-6.4 参照) を利用して単離することもできる。

また、抗原蛋白質をコードする遺伝子が知られている場合に、その蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性領域を解析し (Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157: 105-122 (1982))、二次構造を解析し (Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276 (1978)) アミノ酸配列中の抗原性領域を推定すること (例えば、Anal/Biochem. 151: 540-546 (1985) 参照)、そして、推定されたアミノ酸配列のペプチドを合成しその抗原性を PEPSCAN 法 (Nature 314 (1985); 特表昭 60-500684 号公報) 等により決定することは当業者が容易に行い得ることである。従って、前記方法に基づき決定されたエピトープ部分を含むペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを化学合成等の手法により製造して本発明の抗原の発現ベクターとして用いることもできる。

本発明において用いられる発現ベクターは、 $CD4^+CD25^+$ 制御性 T 細胞により認識される抗原遺伝子を組込んだ組換えベクターであり、抗原遺伝子を挿入するベクターとしてはプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス、及び、当分野において従来用いられているその他のベクターを例示することができる。当業者であれば、例えば、edit. Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.)、及び、edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons 等に記載された技術により、様々なプラスミド及びベクターを構築することが可能である。

ここで用いるプロモーター、ターミネーター等の宿主内における発現制御を行う因子は、当業者であれば宿主の種類及び目的に応じて公知の制御配列から適宜選択し、抗原遺伝子の上流及び／または下流に配置することが可能である。従って、抗原由来の制御配列を用いてもよいし、異種の制御配列を用いることも可能である。また必要であれば、抗生物質耐性マーカー等のマーカーを本発明の発現ベクターの中で用いることも可能である。多数の市販のベクターを利用することができるが、本発明において必須ではないポリヌクレオチド配列を除去すること

が好ましい。

本発明の組成物は naked プラスミドとして使用でき、リボソーム内にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター及び HIV ベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか (例えば、K. Adolph “ウイルスゲノム法” CRC Press, Florida (1996) 参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ (担体) に被覆して用いることができる。これに限定されるわけではないが、好ましくは遺伝子銃等により生体内に導入される金粒子等の担体粒子上に、 $CD4^+CD25^+$ 制御性 T 細胞により認識される抗原を発現させるベクターを付着させた形態のものである。ポリヌクレオチドで担体粒子をコートする技術は公知である (例えば、W093/17706 参照)。最終的にポリヌクレオチドは、生体への投与に適する生理的食塩水等の溶液中に調整することができる。その他、プラスミドの細胞内取り込みの助けとなるカルシウムイオン等の薬剤を併用することも可能である。その他、必要に応じてトランスフェクションを容易にする医薬的に許容される薬剤を合わせて用いることができる。

本発明組成物は、いかなる方法により投与することもできるが、好ましくは、適当な非経口経路、例えば静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法 (電子銃等による)、点鼻薬等の形態での粘膜経路を介する方法等により投与される。これらの投与方法うち、加速粒子による遺伝子形質転換技術は、米国特許第 4, 945, 050 号、第 5, 240, 842 号等にも記載されており、その改良法に基づく装置も市販されている (Biorad Laboratories)。

本発明における宿主動物の種類も限定されないが、具体的には例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、猫、豚、ヒツジ、牛、馬、並びに、サル及びヒト等の霊長類を含む哺乳動物を挙げることができ、中でもヒトがより好ましい宿主動物で

ある。

発明の詳細な説明

本発明において用いられる抗原あるいは発現ベクターの投与量は、疾患の種類、程度、性別、年齢、体重、投与経路等によって異なり限定されないが、通常は一回あたり $0.001\mu\text{g}\sim 1\text{g}$ 、好ましくは $0.01\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 、より好ましくは $0.1\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$ を投与する。

以上のようにして実施された結果として実現される免疫抑制状態はインターフェロン・ガンマの投与、あるいはインターロイキン 12 とインターロイキン 18 の併用投与によって解除される。すなわち、こうしたサイトカインの作用と SEREX 抗原による感作とを適切に組み合わせることにより、制御性 T 細胞を人為的に操作することができ、自己免疫疾患、臓器移植に伴う反応、アレルギー反応および腫瘍免疫の制御等に適用することができる。

さらに免疫抑制状態の解除は、抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体による処理によっても可能である。

従って本発明は、制御性 T 細胞の活性を制御する方法および組成物を提供するものである。

本発明では、SEREX 抗原が制御性 T 細胞の免疫抑制活性を促進することが明らかにされたことにより、制御性 T 細胞の活性を制御する方法が初めて示された。

従来、自己免疫疾患やアレルギーの治療および移植拒絶や移植片対宿主反応を抑制する治療は様々な手法や薬剤が開発されているにもかかわらず有効性に限界があり、これらを超える有効性が求められている。

本発明は近年生体内における重要性がますます明らかにされつつある $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 制御性 T 細胞の作用を制御する極めて有効な方法と組成物を提供するものであり、自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療、臓器・組織移植に伴う療法に大きな進歩をもたらすものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、SEREX 抗原単独による免疫化が肺転移を促進することを示すグラフである。

図 2 は、SEREX 抗原単独免疫化によって誘導された肺転移促進を担う細胞は CD4⁺または CD4⁺CD25⁺細胞であり、CD8⁺細胞ではないことを示すグラフである。

図 3 は、SEREX 抗原単独免疫化マウスからの CD4⁺CD25⁺T 細胞の移植により肺転移が促進されることを示すグラフである。

図 4 は、SEREX 抗原の単独前処理は、mERK2 抗原に特異的な CD8⁺T 細胞の数を抑制することを示すグラフである。

図中、9m-pulsed P1HTR は mERK2 9m 抗原タンパクを、p63-71 (T) -pulsed P1HTR は対照の抗原タンパクを意味する。

図 5 は、mERK2 または 147HER2、及び Dna J-like2 を用いた免疫化による肺転移に対する in vivo の予防・治療効果を示すグラフである。

図 6、図 7、図 8 および図 9 は実施例 4 におけるマウス背部の腫瘍径の測定結果を示す。

図 6 は、BALB/c マウスに対する SEREX 同定自己抗原 DnaJ-like 2 免疫により C57BL/6 由来メラノーマ B16 の拒絶が遷延し一部のマウスが腫瘍死したことを示す。

図 7 は、BALB/c マウスに対する他の SEREX 同定自己抗原免疫の場合も DnaJ-like 2 免疫と同様に C57BL/6 由来メラノーマ B16 の拒絶が遷延し一部のマウスが腫瘍死したことを示す。

図 8 は、BALB/c マウスに対する DnaJ-like 2 免疫により C57BL/6 由来メラノーマ B16 の拒絶の遷延は抗 CD25 抗体投与により解除されたことを示す。

図 9 は、BALB/c マウスに対する DnaJ-like 2 免疫により C57BL/6 由来メラノーマ B16 の拒絶の遷延は抗 GITR 抗体投与により解除されたことを示す。

実施例

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、該実施例は本発明をいかなる意味でも限定することを意図したものではない。

参考例 SEREX 抗原と腫瘍抗原との同時感作による肺転移の阻止

BALB/c 起源の 3-メチルコラントレン誘導肉腫 CMS5m 細胞は、in vivo 注射の後、肺転移を起こし、動物を 5~6 週間以内に死に至らしめる。そこで、総量 0.1ml の 1×10^6 CMS5m 腫瘍細胞を側尾静脈より BALB/c マウスへ投与し、肺転移についてのモデルとした。腫瘍抗原として変異キナーゼである mERK2、SEREX 抗原として DnaJ-like2 を用いた。1) mERK2 をコードするプラスミド、2) mERK2 プラスミドおよびコントロールベクターをコードするプラスミドの混合物、3) mERK2 プ

ラスミドおよび DnaJ-like2 プラスミドの混合物、により腫瘍投与の 14 日前、7 日前、腫瘍投与の日（同日）、または、腫瘍投与から 5 日後に隔週免疫化を開始した（H. Nishikawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 14571-14576 (2001) に記載の方法による）。腫瘍投与から 28 日後にマウスを殺し、肺小瘤数を解剖顕微鏡で数えた。各グループについて 5 匹の動物を用い、結果はその平均 \pm SEM として表した。

腫瘍投与を始める 14 日前にマウスを mERK2 をコードするプラスミドで免疫化することにより肺転移を完全に予防することができた。この予防的な効果は、腫瘍投与の 7 日前に行った場合、または腫瘍投与後に行った場合には見られなかった（図 5 参照）。それに対して、mERK2 プラスミドおよび DnaJ-like2 プラスミドを組合わせた免疫化では、腫瘍投与から 5 日後までの免疫化でも転移が完全に予防された（図 5 参照）。転移の有無は組織病理学的試験により確認した。図中の数値は各グループについて 5 匹のマウスの平均 \pm SEM として表される。

実施例 1 SEREX 抗原単独感作による肺転移の促進

参考例と同様の肺転移モデルにおいて、腫瘍投与の 5 日後に SEREX 抗原をコードするプラスミドまたはコントロールベクターで免疫したマウスを腫瘍投与後 28 日目に殺し、肺小瘤数を数えた。SEREX 抗原として熱ショックタンパク質 DnaJ-like2、DNA リガーゼ 1、ガレクチン 8 およびポリ A 結合タンパク質サイトプラスミックの 4 種類（いずれもマウスのタンパク質）各々のプラスミドで免疫した場合は小瘤数は 130-170 であり、こうした免疫をしない場合には小瘤数は 30-50 であった。これに対し、SEREX 分析を繰り返しても検出されなかったマウス分子 3 種、グルコース制御タンパク質、分泌ネクシンおよび TCP-1 ゼータ 1 サブユニット (Cctz-1) 含有シャペロンをコードするプラスミドで免疫した場合には、転移の促進は観察されなかった（図 1a、1b）。また、ヒト SEREX 抗原 3 種類（Homo sapiens HMBA 誘導タンパク質、ヒトレチノイン酸応答タンパク質およ

び *H. sapiens* 肝炎デルタ抗原反応タンパク質 A) やオブアルブミンなど異種のタンパク質をコードするプラスミドで免疫しても転移の促進は観察されなかった (図 1a)。すなわち、自己抗原としての SEREX 抗原による単独感作が転移を促進していることが示唆された。

そこで、この転移促進に関与している細胞表現型を解析した。マウスを抗 CD4 モノクローン抗体や抗 CD25 モノクローン抗体で前処理しておく、DnaJ-like2 感作による転移促進は全くなかった (図 2a、2b)。抗 CD25 モノクローン抗体による前処理のみの場合には、前処理もない場合に比べて転移小瘤はかなり減少した (図 2b)。また、抗 CD8 モノクローン抗体で前処理し DnaJ-like2 で感作した場合は転移の促進が抗体前処理のない場合と同程度に観察された (図 2c)。この結果から、転移の促進は CD4⁺または CD4⁺CD25⁺T 細胞が担っていることが示された。

実施例 2 SEREX 抗原で感作された CD4⁺CD25⁺T 細胞は肺転移を促進する

実施例 1 で得られた結果を直接的に確認するために、SEREX 抗原で感作された CD4⁺CD25⁺T 細胞を腫瘍接種マウスに移植して転移の促進の有無を調べた。すなわち、DnaJ-like2 抗原で免疫したマウスから腫瘍マウスに CD4⁺CD25⁺T 細胞を移植した場合には肺転移を著しく促進したが、CD4⁺CD25⁺T 細胞を移植した場合には肺転移の促進はほとんど観察されなかった。また、感作されていない CD4⁺CD25⁺T 細胞を移植した場合は、移植していない場合に比して有意な転移促進が観察されたが、それは感作された CD4⁺CD25⁺T 細胞を移植した場合に比してずっと小さいものであった (図 3)。

実施例 3 SEREX 抗原による前処理は CD8⁺T 細胞ではなく、CD4⁺T 細胞の活性を抑える

本発明者らは先に、腫瘍接種マウスに各々腫瘍抗原および SEREX 抗原をコードするプラスミドを投与すると強力な抗腫瘍免疫応答を惹起できること、その際

CD4⁺T 細胞のヘルパー機能が著しく増強され、CD8⁺T 細胞応答増幅は CD4⁺T 細胞に依存するものであることを報告した (H. Nishikawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 14571-14576 (2001); WO 03/000894 A1)。

そこで、実施例 2 で確認した抗腫瘍免疫応答の抑制において、CD8⁺T 細胞と CD4⁺T 細胞の免疫応答性が変化しているか否かを調べた。腫瘍抗原として変異キナーゼである ERK2 の 9 マーのペプチド mERK2 9m を用いた。マウスを DnaJ-like2 で前免疫し、その上で mERK2 9m をコードするプラスミド単独、あるいはこれと DnaJ-like2 をコードするプラスミドと併用で免疫して、ELISPOT アッセイにより mERK2 9m 特異的 CD8⁺T 細胞を分析した。mERK2 9m 単独の場合は、DnaJ-like2 前処理が CD8⁺T 細胞を変化させなかった (図 4a) が、併用免疫の場合は、DnaJ-like2 前処理がない時に観察されたヘルパー活性の増強が DnaJ-like2 前処理により全く消滅してしまった (図 4b)。この結果から、SEREX 抗原で免疫すると、CD8⁺T 細胞ではなく、CD4⁺T 細胞のヘルパー活性が抑制されることが明らかになった。なお、 α -GalCer-CD1d テトラマーによる解析により、局所のナチュラルキラー T (NKT) 細胞の細胞数減少が認められた。

以上の実施例 1、実施例 2 および実施例 3 により、マウス腫瘍転移モデルにおける抗腫瘍免疫応答を例として、SEREX 抗原をコードするプラスミド単独による処理が CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を活性化する結果として CD4⁺ヘルパー T 細胞の活性を抑制し、免疫応答全体を抑制することが実験的に証明された。

実施例 4 制御性 T 細胞活性制御による同種免疫応答の制御

本発明者は、担癌マウス血清を用い SEREX 法により担癌個体の免疫系が認識する変異のない野生型自己抗原 (SEREX 同定自己抗原) を同定してきた。SEREX 同定自己抗原は IgG に認識されることより CD4 細胞に認識されると考えられる。これら SEREX 同定自己抗原と細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 認識癌拒

絶抗原をヘリオス型遺伝子銃(Helios 社 Gene Gun®)を用いて共免疫した場合、強いヘルパー効果を発揮する。

一方、SEREX 同定自己抗原単独の免疫ではマウス肉腫肺転移モデルでは腫瘍の増悪を認め、免疫を抑制的に制御すると考えられた。

この機構は SEREX 同定自己抗原単独免疫では制御性 $CD4^+CD25^+T$ 細胞を活性化し NKT を減少させるためと考えられている。本実施例では SEREX 同定自己抗原単独の免疫による免疫抑制効果が移植などの同種免疫応答にどのように関与するのかを検討するために、SEREX 同定自己抗原単独の免疫を行ったマウスに対し、他系統のマウス由来の腫瘍を接種しその増殖に及ぼす影響を検討した。

(1) 材料および方法

マウス： BALB/c(H-2d)および C57BL/6(H-2b)マウスを用いた。

プラスミド：SEREX 同定自己抗原遺伝子 (DnaJ-like 2、Mus DNA Ligase 1(Ligase 1)、Mus poly(A) binding protein, cytoplasmic 1(Poly A)) を pBK-CMV プラスミドに組み込み金粒子にコーティングした。

遺伝子導入 (免疫)：SEREX 同定自己抗原を単独でヘリオス型遺伝子銃によりマウス腹部皮内に 2 週間隔で免疫した。

腫瘍接種：SEREX 同定自己抗原単独 2 回目免疫の 1 週間後、BALB/c マウスには C57BL/6 由来メラノーマ細胞株 B16 を、C57BL/6 マウスには BALB/c 由来線維肉腫細胞株 CMS5a をそれぞれ 1×10^6 個を背部皮下に接種した。

腫瘍接種後、経時的にマウス背部の腫瘍径を測定した。(図 6 ~ 9 参照)

抗体：抗 CD25 抗体はハイブリドーマ PC61 より硫酸分画により濃縮し 0.25mg 投与した。

抗 GITR (Glucocorticoid-induced TNF receptor superfamily

18) 抗体はハイブリドーマ DTA-1 (京都大学・坂口志文教授より供与) 腹水を 8 倍希釈して 200 μ l (25 μ l) 投与した。

抗 CD4 抗体はハイブリドーマ GK1.5 腹水を 8 倍希釈して 200 μ l (25 μ l) 投与した。抗体投与はいずれの抗体も腫瘍接種直前に 1 回のみ行った。

(2) 結果と考察

BALB/c マウスでは SEREX 同定自己抗原による免疫により C57BL/6 マウス由来の腫瘍拒絶が遷延し、一部のマウスは腫瘍死した。

この現象は抗 CD25 抗体の投与、抗 GITR 抗体の投与によりキャンセルされたことより CD4⁺CD25⁺T 細胞が関与していると考えられた。

SEREX 同定自己抗原の免疫により免疫応答が抑制的に制御された結果、同種免疫応答も低下しているものと考えられた。

請求の範囲

1. CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞により認識される抗原を含む組成物。
2. CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞により認識される抗原が SEREX 法により同定される分子である請求項 1 記載の組成物。
3. CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞により認識される抗原をコードする発現ベクターを含む組成物。
4. CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞により認識される抗原が SEREX 法により同定される分子である請求項 3 記載の組成物。
5. SEREX 法により同定される分子が自己抗原である、請求項 2 または 4 記載の組成物。
6. SEREX 法により同定される分子が、DnaJ-like2 (GenBank Accession No. : NM_005494, XM_028966, XM_172161, XM_052862, XM_062754, XM_093388, NM_016306, NM_012328, NM_005880)、ガレクチン [Galectin] 8 (GenBank Accession No. : AH008815, AF193806, AF193805)、ポリ A 結合タンパク質 [PolyA binding protein] (GenBank Accession No. : XM_067844)、リガーゼ [Ligase] 1 (GenBank Accession No. : NM_000234) から選ばれた 1 種である請求項 2、4 および 5 のいずれか 1 項記載の組成物。
7. 遺伝子銃を用いて投与される、請求項 3 ないし 6 のいずれか 1 項記載の組成物。
8. 自己免疫疾患の予防及び／または治療のための請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項記載の組成物。
9. アレルギー疾患の予防及び／または治療のための請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項記載の組成物。
10. 臓器または組織の移植において、拒絶反応及び／または移植片対宿主反

応を抑制するための請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項記載の組成物。

1 1. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の組成物を哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物において免疫応答を抑制する方法。

1 2. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の組成物を哺乳動物へ投与して哺乳動物において免疫応答を抑制し、さらにインターフェロン・ガンマを投与して該哺乳動物の免疫応答を回復せしめることを含む哺乳動物の免疫制御方法。

1 3. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の組成物を哺乳動物へ投与して哺乳動物において免疫応答を抑制し、さらにインターロイキン 12 およびインターロイキン 18 を投与して該哺乳動物の免疫応答を回復せしめることを含む哺乳動物の免疫制御方法。

1 4. 薬理上有効な量の請求項 1 記載の組成物を哺乳動物へ投与することを含む自己免疫疾患の予防及び／または治療する方法。

1 5. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の組成物を自己免疫疾患の予防剤及び／または治療剤を製造することに用いる用途。

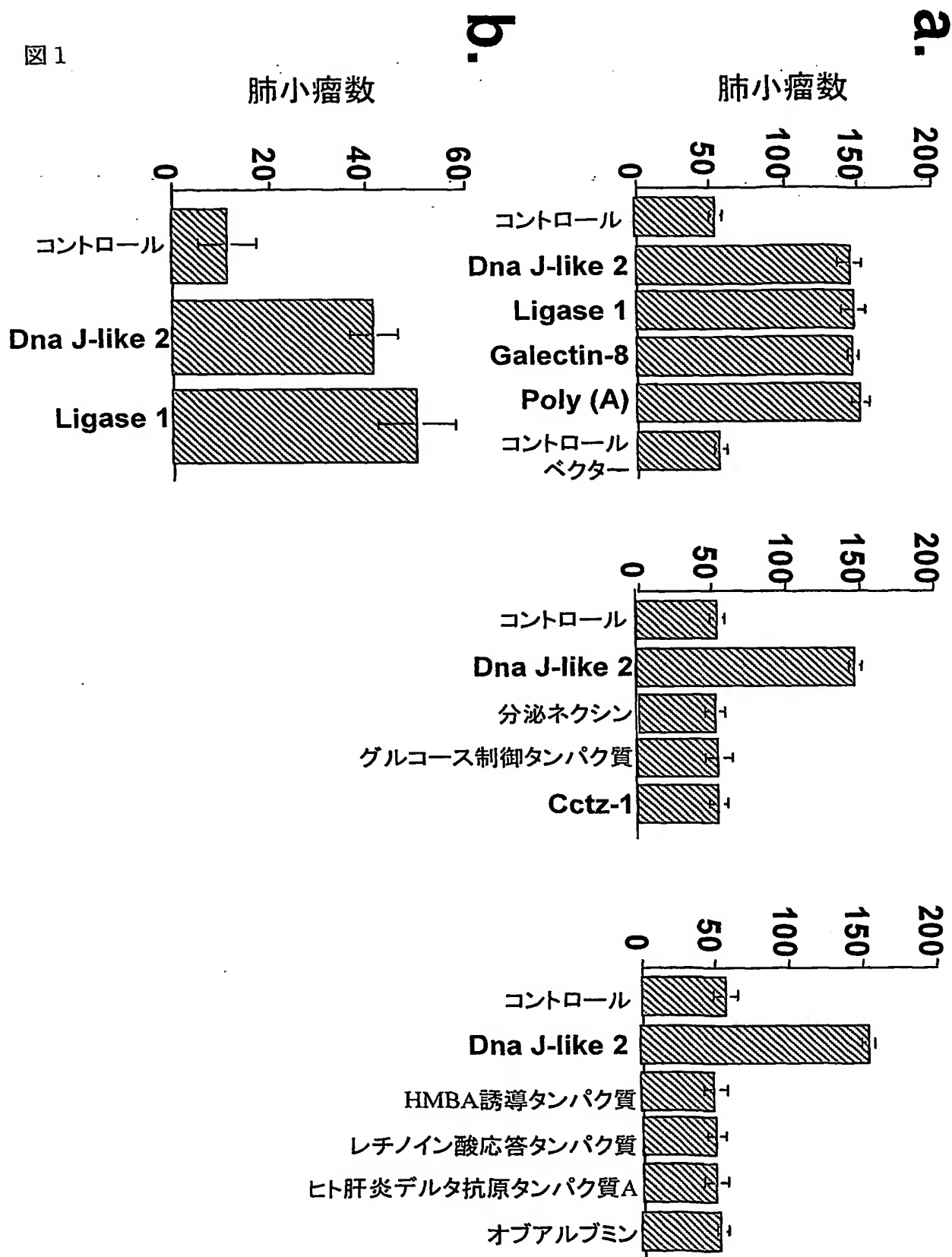
1 6. 薬理上有効な量の請求項 1 記載の組成物を哺乳動物へ投与することを含むアレルギー疾患の予防及び／または治療する方法。

1 7. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の組成物をアレルギー疾患の予防剤及び／または治療剤を製造することに用いる用途。

1 8. 薬理上有効な量の請求項 1 記載の組成物を哺乳動物へ投与することを含む、臓器または組織の移植において拒絶反応及び／または移植片対宿主反応を抑制する方法。

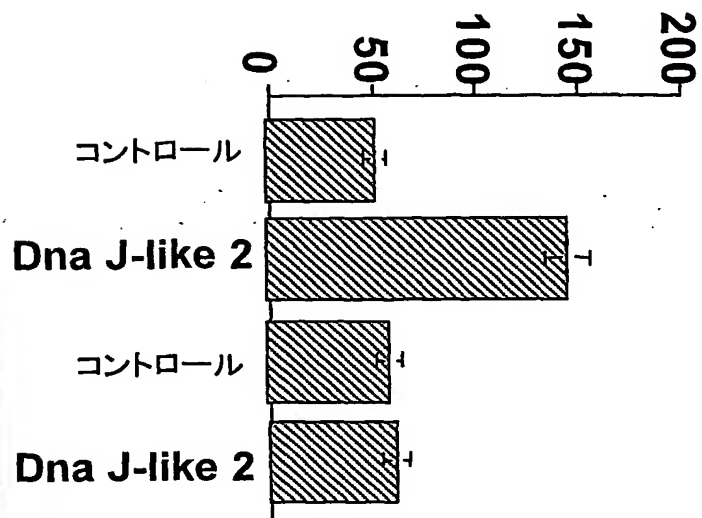
1 9. 請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の組成物を臓器または組織の移植において拒絶反応及び／または移植片対宿主反応を抑制する予防剤及び／または治療剤を製造することに用いる用途。

図 1

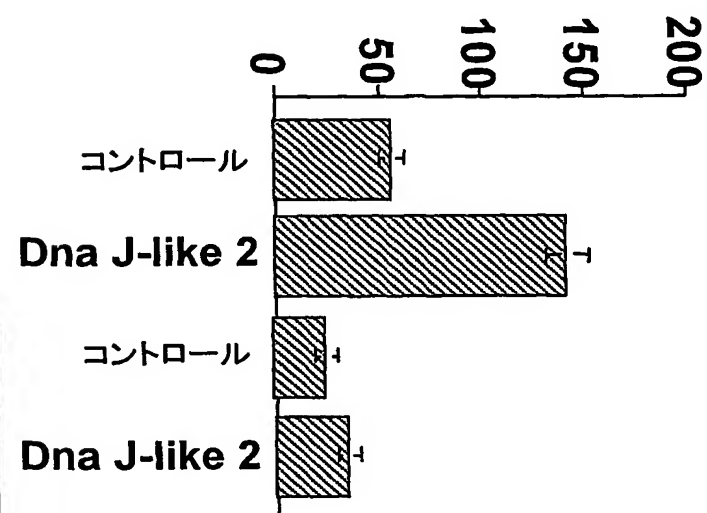


肺小瘤数

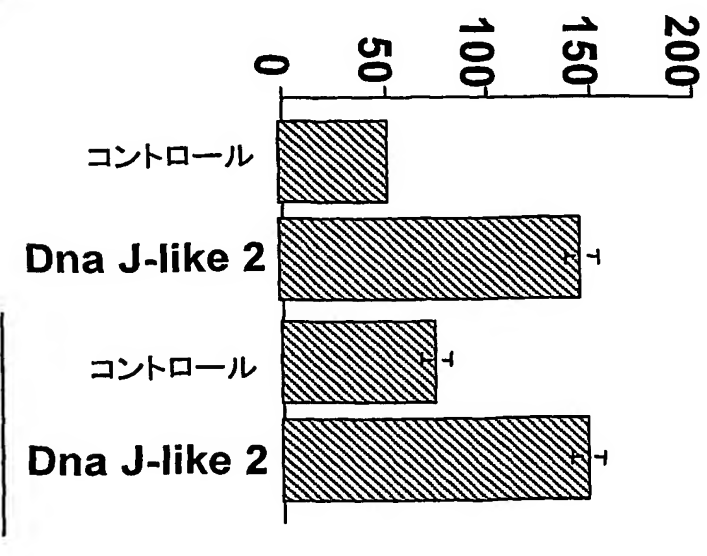
a



b



c



anti-CD4 mAb 処理

anti-CD25 mAb 処理

anti-CD8 mAb 処理

図 2

3

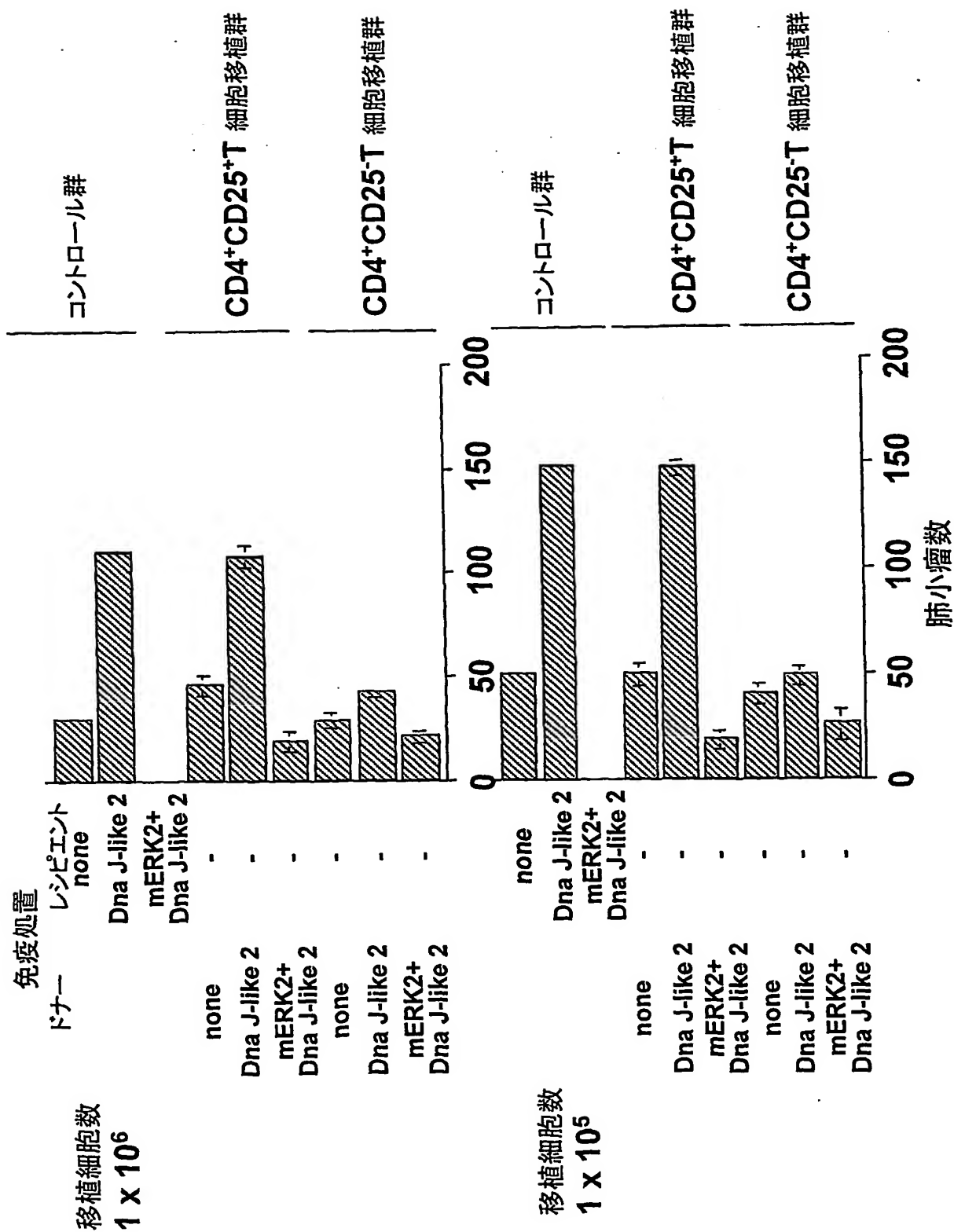
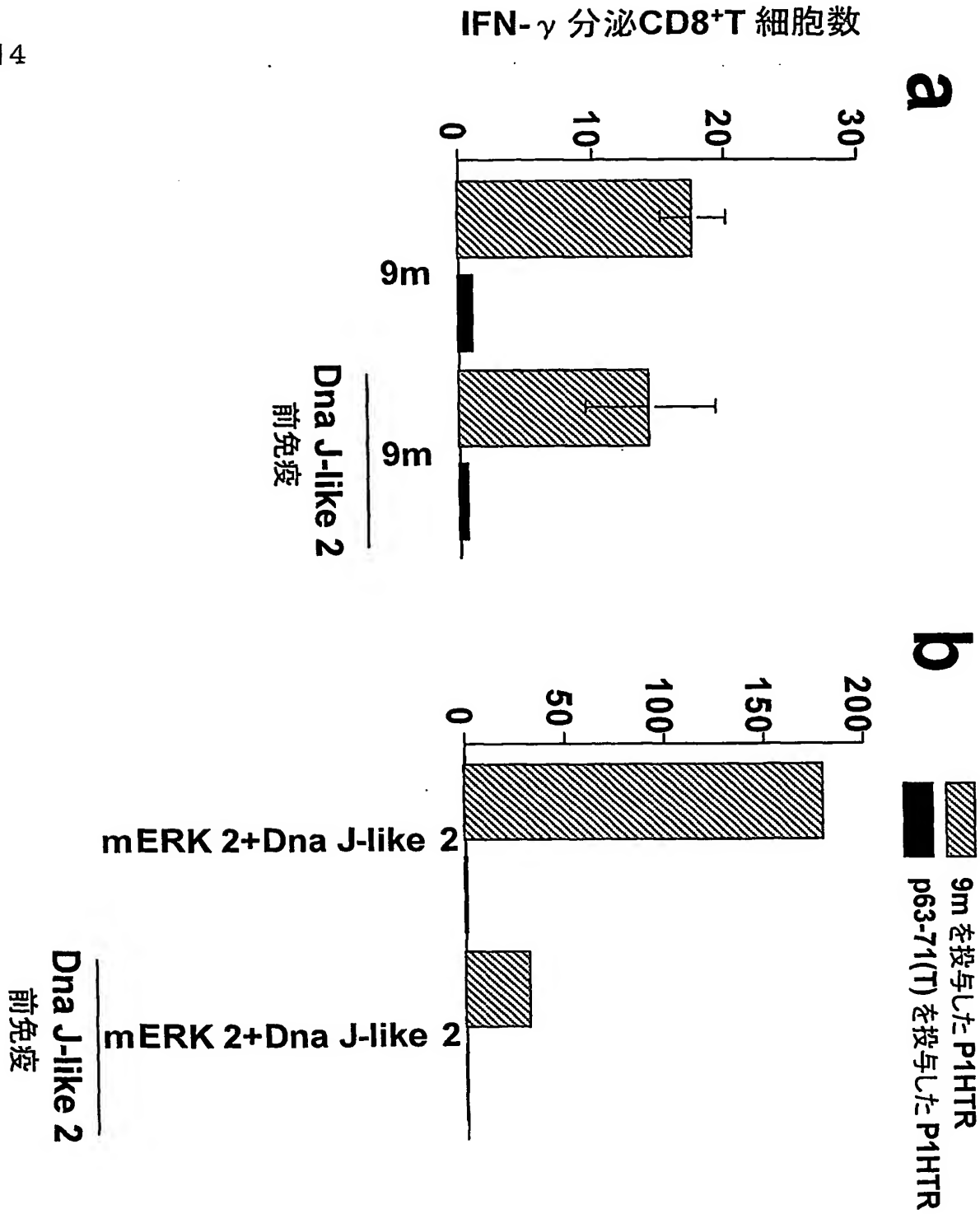
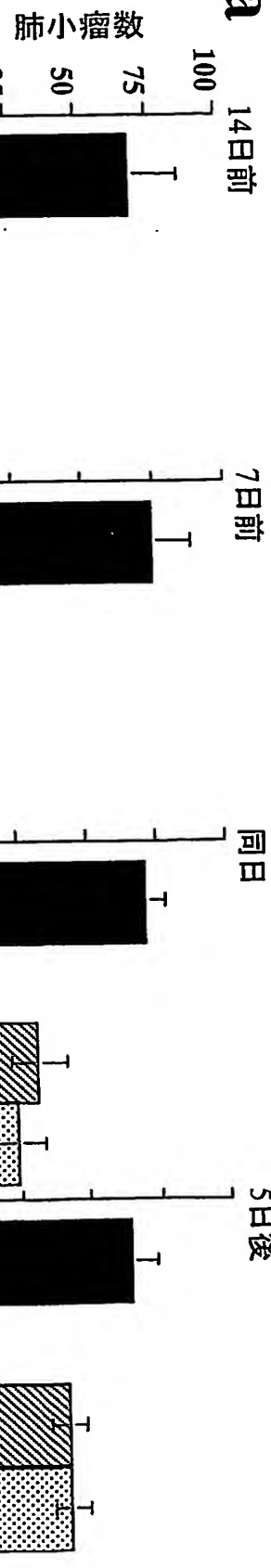


図 4



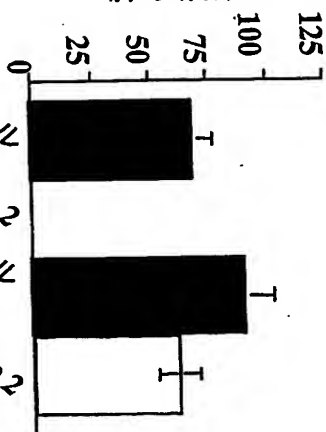
a



c

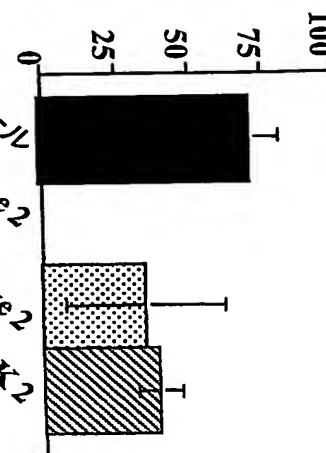
5日後

肺小瘤数



b

5日後



d

5日後

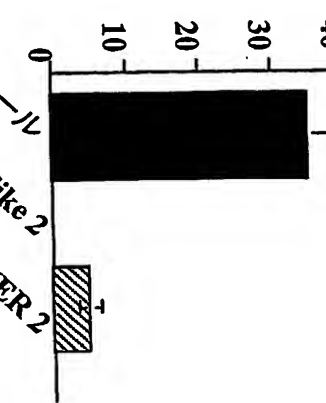


図 5

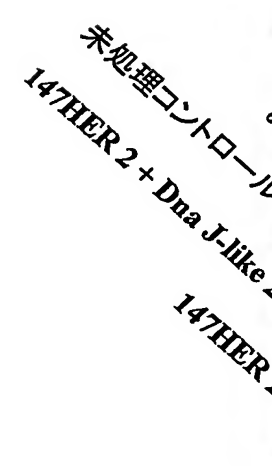
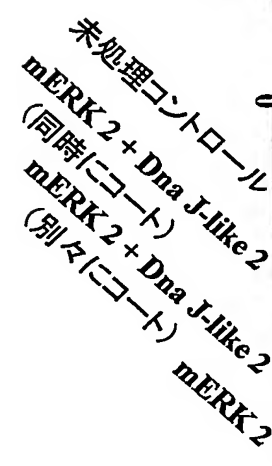
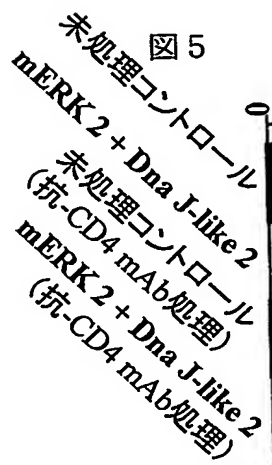


図 6

C57BL/6 (H-2b) → BALB/c(H-2d)

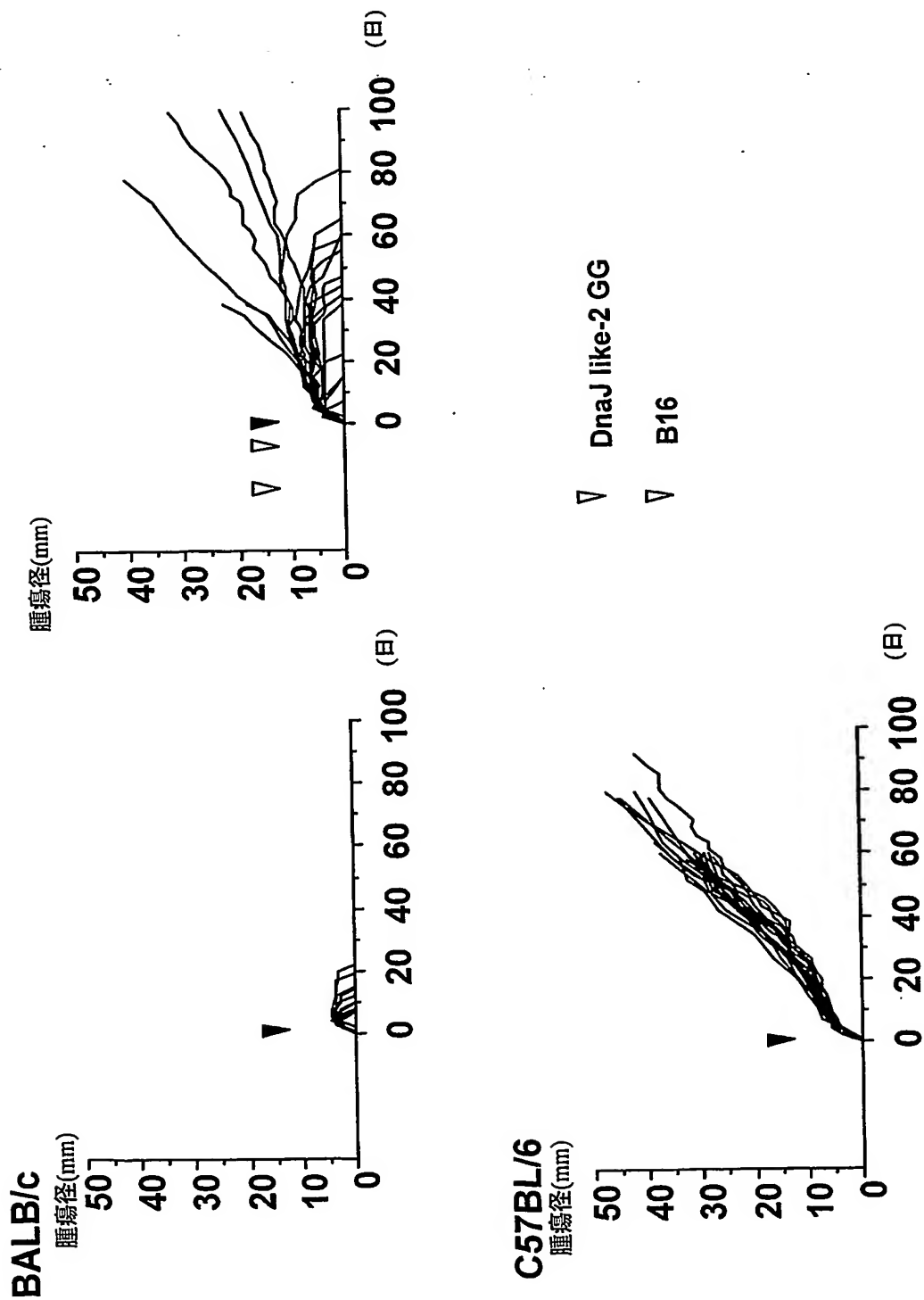


図 7

C57BL/6 (H-2b) → BALB/c(H-2d)

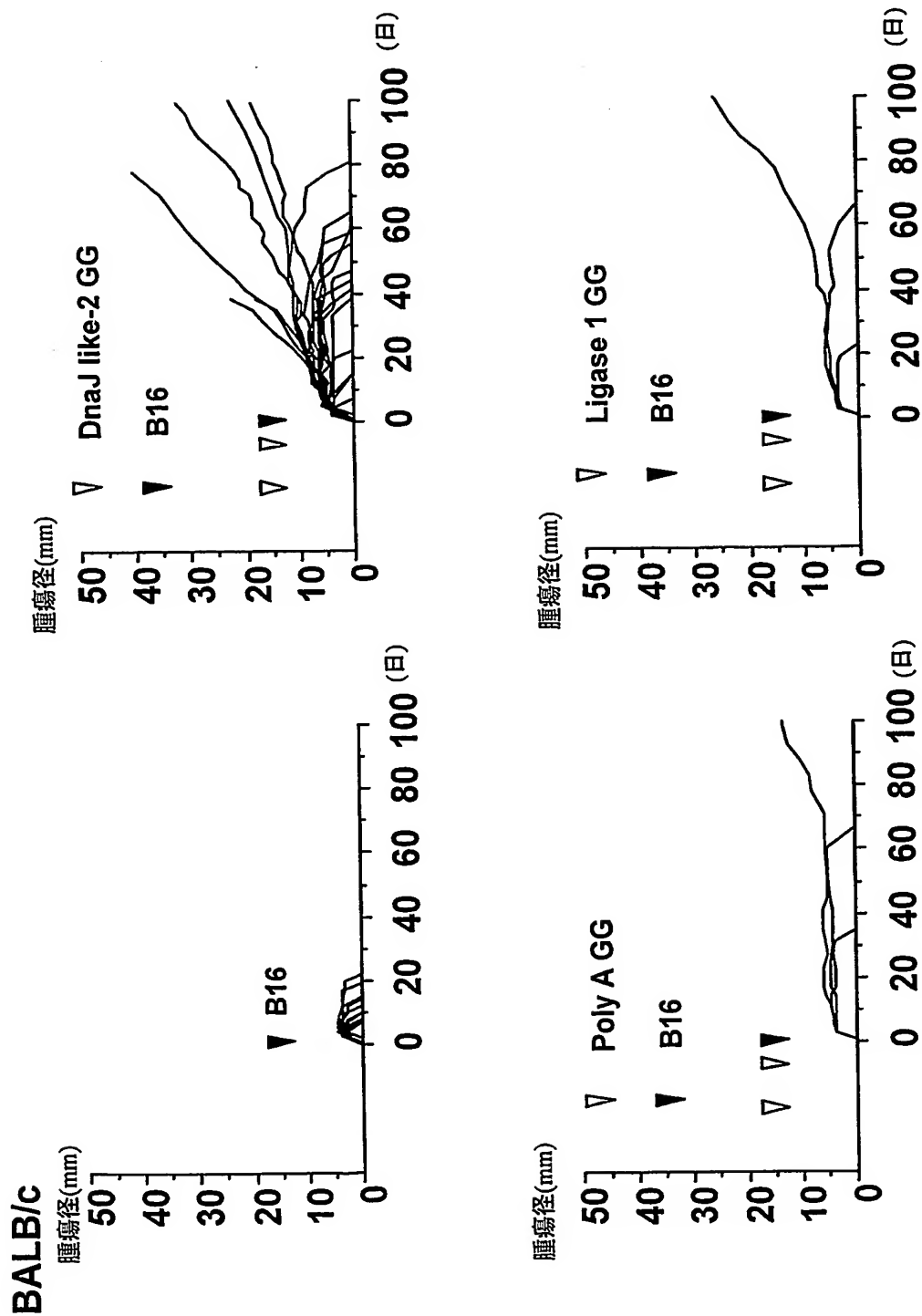


図 8

C57BL/6 (H-2b) → BALB/c(H-2d)

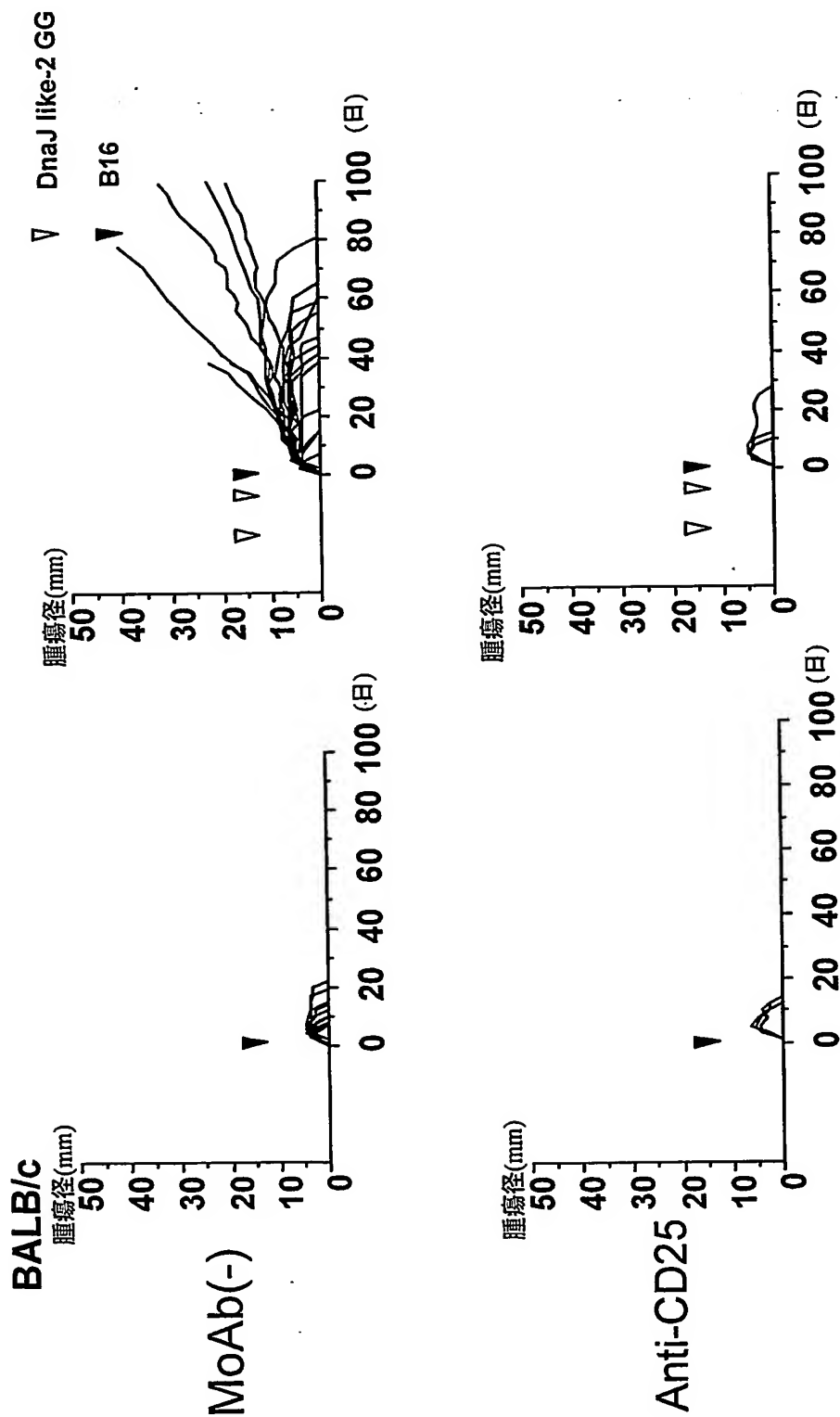
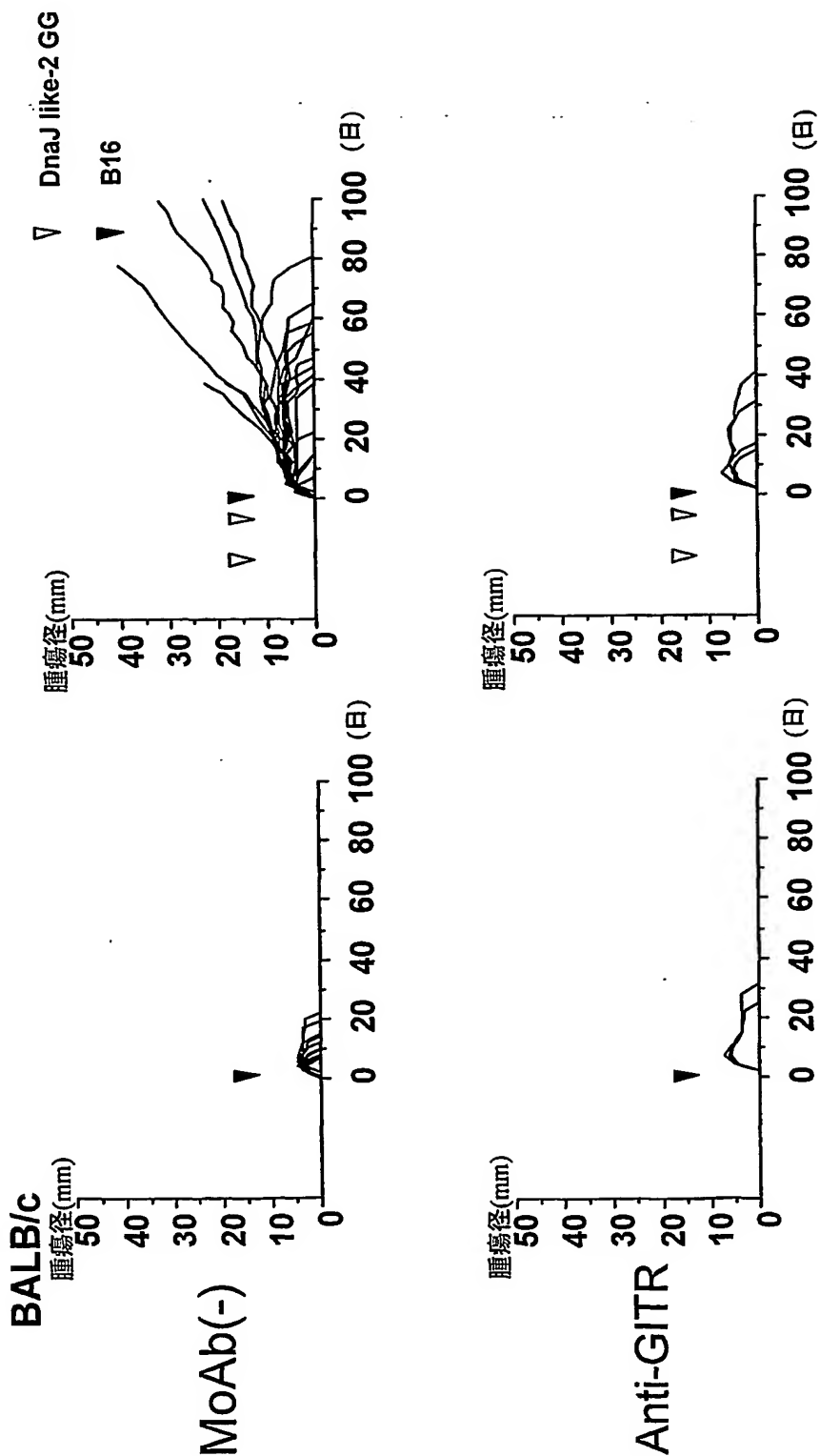


図 9

C57BL/6 (H-2b) → BALB/c(H-2d)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, 38/21, 38/36, 38/53, 48/00, A61P35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-39/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	NISHIKAWA, Hiroyoshi et al., Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity, Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 04 December, 2001 (04.12.01), Vol.98, No.25, pages 14571 to 14576	1-7 8-10, 15, 17, 19
X A	YU, Min et al., HEDJ, an Hsp40 Co-chaperone Localized to the Endoplasmic Reticulum of Human Cells, The Journal of Biological Chemistry, 11 August, 2000 (11.08.00), Vol.275, No.32, pages 24984 to 24992	1-7 8-10, 15, 17, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 December, 2003 (02.12.03)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11080

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BARNES, Deborah E. et al., Human DNA ligase I cDNA: Cloning and functional expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 01 September, 1990 (01.09.90), Vol.87, No.17, pages 6679 to 6683	1-7 8-10,15,17, 19
A	SHIMIZU, Jun et al., Induction of Tumor Immunity by Removing CD25 ⁺ CD4 ⁺ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity, The Journal of Immunology, 15 November, 1999 (15.11.99), Vol.163, No.10, pages 5211 to 5218	1-10,15,17, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11080

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11 to 14, 16, 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 11 to 14, 16, 18 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00, 38/21, 38/36, 38/53, 48/00, A61P35/00, 37/02, 37/06, 37/08, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-39/44

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	NISHIKAWA, Hiroyoshi <i>et al.</i> , Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, December 4, 2001, Volume 98, Number 25, pages 14571-14576	1-7 8-10, 15, 17, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.12.03

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4P

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	YU, Min <i>et al.</i> , HEDJ, an Hsp40 Co-chaperone Localized to the Endoplasmic Reticulum of Human Cells, The Journal of Biological Chemistry, August 11, 2000, Volume 275, Number 32, pages 24984-24992	1-7 8-10, 15, 17, 19
X A	BARNES, Deborah E. <i>et al.</i> , Human DNA ligase I cDNA: Cloning and functional expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, September 1, 1990, Volume 87, Number 17, pages 6679-6683	1-7 8-10, 15, 17, 19
A	SHIMIZU, Jun <i>et al.</i> , Induction of Tumor Immunity by Removing CD25 ⁺ CD4 ⁺ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity, The Journal of Immunology, November 15, 1999, Volume 163, Number 10, pages 5211-5218	1-10, 15, 17, 19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-14, 16, 18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲11-14, 16, 18に記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。